

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592041

研究課題名（和文）膀胱癌発生における Variant cyclin D1b の役割の解明

研究課題名（英文）Analysis for the role of variant cyclin D1b in bladder carcinogenesis

研究代表者

金 哲將 (KIM TETSUSYO)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10204968

研究成果の概要（和文）：

ヒト cyclin D1 は alternative splicing により、cyclin D1a と cyclin D1b の 2 種類のアイソフォームが存在する。Cyclin D1b は正常細胞では発現しておらず、種々の癌での発現が確認され、癌化との関連が示唆されている。In vivo での cyclin D1b と発癌の関連を調べるためトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。膀胱特異的に発現させた Tg マウスでは、膀胱腫瘍の発生を確認することはできなかった。全組織に発現させた Tg マウスではメス約 60% に直腸腫瘍が発生した。病理組織学的検査では、腺癌・sessile serrated adenoma (SSA)・Traditional serrated adenoma (TSA) が確認できた。この Tg マウスは、結腸・直腸癌の癌化機構で最近注目されている serrated pathway のよいモデルになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Human cyclin D1b gene generates two major isoforms, cyclin D1a and cyclin D1b by alternative splicing. Cyclin D1b, which lacks the ability to bind to CDK4 and phosphorylated Rb, is hardly expressed in normal tissues but is frequently expressed in certain types of cancer tissues including bladder cancers. To clarify the oncogenic potential of cyclin D1b variant, we engineered transgenic (Tg) mice with the human cyclin D1b transgene by pCAGGS promoter, which is able to ubiquitously express transgene. We found that rectal tumors including adenocarcinoma, sessile serrated adenoma (SSA), traditional serrated adenoma (TSA) and hyperplastic polyp (HHP) were generated in about 60% of female Tg mice. This Tg mouse would become a good model of colorectal carcinogenesis via the serrated pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：尿路上皮癌、cyclin D1b、癌遺伝子、スプライシング、Tg マウス

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は尿路上皮癌を中心とした泌尿生殖器癌の癌化機構の解析とその臨床応用の研究を行ってきた。この過程で、cyclin D1の alternative splicing で生じる variant cyclin D1b に注目し膀胱癌における cyclin D1b の発現と癌発生の関連について解析を進め、(1) 正常膀胱では発現していない spliced variant cyclin D1b が、約 60%の膀胱癌組織と膀胱癌細胞株に発現していること、(2) cyclin D1b の発現していない膀胱癌細胞株に cyclin D1b を導入すると細胞増殖能に影響を与えることなく細胞浸潤能を促進すること、(3) cyclin D1b を発現している膀胱癌細胞において siRNA により knockdown すると細胞浸潤能が抑制されること、(4) cyclin D1b は、cyclin D1a と異なり、CDK4 を介した Rb リン酸化を増強することなく、細胞浸潤活性を促進すること、を明らかにしてきた。この成果をふまえて、本研究では膀胱癌発生における cyclin D1b の役割をより詳細に明らかにし、治療法の開発に繋げようとするものである。

2. 研究の目的

膀胱特異的 promoter である uroplakin promoter、および全組織で発現する pCAGGS promoter を用いて、cyclin D1b を膀胱特異的および全組織に発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、膀胱癌および全組織での癌発生における cyclin D1b の役割を明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 膀胱特異的 promoter である uroplakin promoter と全組織で発現する pCAGGS の下流に、発現させる cyclin D1b cDNA の N 末端に Flag-tag をつけた発現ベクターを作製し、マウス卵に injection する。

① 生れてきたマウスについて、PCR 法によりゲノムに取り込まれた導入遺伝子を確認し、RT-PCR およびウエスタンブロット (WB) 法により cyclin D1b 発現 Tg マウスをスクリーニングする。

② 目的の Tg マウスの繁殖・系統維持を行い、膀胱特異的および全組織に cyclin D1b を発現する cyclin D1b 発現マウス系統を樹立する。

(2) cyclin D1b 発現 Tg マウスの解析

① 膀胱および全組織の腫瘍発生を調べ、発生した腫瘍組織の病理解析を行なう。

② 発生した腫瘍組織から細胞株を樹立し、cyclin D1b の発現・ヌードマウスでの造腫瘍

活性とその病理組織学検討を行なう。また、siRNA により cyclin D1b の発現を knockdown し、細胞増殖活性・足場非依存性増殖。細胞浸潤能・造腫瘍活性などの癌化形質に及ぼす影響を検討する。

③ wild-type (WT) 由来マウス胎児線維芽細胞 (MEF) と pCAGGS-cyclin D1b Tg マウス由来 MEF (D1b-MEF) を調製し、細胞および分子レベルでの解析を行なう。

④ WT-MEF と D1b-MEF に retrovirus vector (pBP) を用い、コントロールと活性化 H-ras 遺伝子を導入した細胞株を樹立し細胞および分子レベルでの解析を行なう。

(3) pCAGGS promoter を用いた Tg マウスのメスに直腸腫瘍が発生したことより、6-8 週齢のメス Tg マウスの両側卵巣を摘除した群と sham 手術をした群とで直腸腫瘍発生頻度に検討を加え、腫瘍発生における性ホルモンの関与の可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) 膀胱特異的 cyclin D1b 発現 Tg マウスを 1 系統樹立した。このマウスの繁殖・系統維持を継続したが、この実験系では腫瘍発生を確認することはできなかった。

(2) pCAGGS-cyclin D1b Tg マウスを 2 系統 (14F と 26F) 樹立し、繁殖・系統維持を行なった。

① 14F では、メス 24 匹中 15 匹 (62.5%)、オス 24 匹中 1 匹 (4.2%) に直腸腫瘍が発生した。26F では、メス 13 匹中 4 匹 (30.8%) に直腸腫瘍が発生したが、オス 8 匹には発生しなかった。一方、WT のメス 29 匹、オス 19 匹には直腸腫瘍は発生しなかった。腫瘍は、一匹の例外を除いてメス Tg マウスのみが発生した。これらの腫瘍は、粘膜・皮膚移行部に発生する特徴を持つことより、体表からの腫瘍確認が容易である。14F の場合、生後平均 9.1±3.8 (5-17) か月で腫瘍が確認できた。

② 直腸腫瘍を病理組織学的に検討したところ、14F の場合腺癌 4 例 (25.0%)、sessile serrated adenoma (SSA) 5 例 (31.3%)、traditional serrated adenoma (TSA) 6 例 (37.5%)、hyperplastic polyp (HHP) 1 例 (6.3%) であった。26F の場合腺癌 1 例 (25.0%)、SSA 2 例 (50.0%)、TSA 1 例 (25.0%) であった。腺癌が認められる腫瘍組織では SSA も認められた。この結果より、pCAGGS-cyclin D1b Tg マウスは、最近、結腸・大腸癌の発生のメカニズムとして注目されている serrated pathway のモデルマウスになると考えられる。

(3) 14F メスの直腸腫瘍(SSA)より、細胞株(D1bTgSSA)を樹立した。

①D1bTgSSAは、ヌードマウスに造腫瘍活性を示し、病理組織学的検討により tubular structure が確認できた。

②siRNAにより、D1bTgSSAの cyclin D1b を knockdown すると、細胞増殖活性、足場非依存性増殖、細胞浸潤能、造腫瘍活性を抑制した。この結果から、cyclin D1bの発現が、癌化形質の発現に重要な働きをしていることが示された。

(4)6-8 週齢のメス 14F Tg マウスの両側卵巣を摘除し、直腸腫瘍発生における女性ホルモンの関与を検討した。卵巣摘除した 10 匹では、生後 18 ヶ月経過観察したが、直腸腫瘍の発生は確認できなかった。一方、sham手術を行なった 5 匹では、2 匹に 10 ヶ月目と 12 ヶ月目に腫瘍が確認でき、病理組織学的検討の結果それぞれ腺癌と SSA であった。これらの結果から cyclin D1b 発現 Tg マウスの腫瘍発生には、女性ホルモンが関与している可能性が示された。

(5) WT-MEF と D1b-MEF にレトロウイルスベクター(pBP)のみと H-ras を導入し WT-MEF/pBP, WT-MEF/ras, D1b-MEF/pBP, D1b-MEF/ras を樹立した。WT-MEF/pBP と D1b-MEF/pBP を比較すると、足場非依存性増殖と細胞浸潤能が D1b-MEF/pBP で亢進していた。細胞浸潤に関与する上皮間葉転換(EMT)に関与する分子を WB 法で検討すると、D1b-MEF/pBP では WT-MEF/pBP に比べ Akt のリン酸化が亢進し、E-cadherin の発現が抑制されていた。H-ras を導入すると D1b-MEF の悪性化形質(細胞増殖活性・足場非依存性増殖・細胞浸潤能・造腫瘍活性)が著明に亢進された。Akt inhibitor を用い D1b-MEF の Akt リン酸化を抑制すると細胞浸潤能が抑制された。これらの結果より、Akt を介した EMT のコントロールが cyclin D1b による癌化活性に重要な働きをしていると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Tambe Y, Okuyama N, Nakagawa K, Muramoto A, Hasebe M, Chano T, Inoue H: Suppression of viral replication by drs tumor suppressor via mTOR dependent pathway. Cancer Lett 314: 82-91, 2012. 査読有
- ② Ochi Y, Chano T, Ikebuchi K, Inoue H, Isono T, Arai A, Tameno H, Shimada T, Hisa Y, Okabe H: RB1CC1 activates the

p16 promoter through the interaction with hSNF5. Oncol Rep 26: 805-812, 2011. 査読有

- ③ Kim CJ, Sano T, Takimoto K: Miliary tuberculosis following transrectal ultrasonography (TRUS)-guided prostate biopsy: report of a case. Korean J Urol 56: 425-427, 2011. 査読有
- ④ Kim CJ, Sakamoto K, Tambe Y, Inoue H: Opposite regulation of epithelial-to-mesenchymal transition and cell invasiveness by periostin between prostate and bladder cancer cells. Int J Oncol 38: 1756-1766, 2011. 査読有
- ⑤ Chano T, Ikebuchi K, Tomita Y, Jin Y, Inaji H, Ishitobi M, Teramoto K, Ochi Y, Tameno H, Nishimura I, Minami K, Inoue H, Isono T, Saitoh M, Shimada T, Hisa Y, Okabe H: RBCC1 together with RB1 and p53 predicts long-term survival in Japanese breast cancer patients. PLoS ONE 5: e15737, 2010. 査読有
- ⑥ Chano T, Ikebuchi K, Ochi Y, Tameno H, Tomita Y, Jin Y, Inaji H, Ishitobi M, Teramoto K, Nishimura I, Minami K, Inoue H, Isono T, Saitoh M, Shimada T, Hisa Y, Okabe H: RBCC1 activates RB1 pathway and inhibits proliferation and cologenic survival in human cancer. PLoS ONE 5:e11404, 2010. 査読有
- ⑦ Kim CJ, Takimoto K, Tomita K: Parastomal hernia after the construction of tubeless cutaneous ureterostomy: Report of a case. Jpn J Urol Surg 23: 869-871, 2010. 査読有
- ⑧ Tambe Y, Yamamoto A, Isono T, Chano T, Fukuda M, Inoue H: The Drs tumor suppressor is involved in the maturation process of autophagy induced by low serum. Cancer Lett 283: 74-83, 2009. 査読有
- ⑨ Shimakage M, Kodama K, Kawahara K, Kim CJ, Ikeda Y, Yutsudo M, Inoue H: Downregulation of drs tumor suppressor gene in highly malignant pulmonary neuroendocrine tumors. Oncol Rep 21: 1367-1372, 2009. 査読有
- ⑩ Kim CJ, Nishi K, Isono T, Okuyama Y, Tambe Y, Okada Y, Inoue H: Cyclin D1b variant promotes cell invasiveness independent of binding to CDK4 in human bladder cancer cells. Mol Carcinogenesis 48: 953-964, 2009. 査読有

- ⑪ Isono T, Kim CJ, Ando Y, Sakurai H, Okada Y, Inoue H: Suppression of cell invasiveness by periostin via TAB1/TAK1. Int J Oncol 35: 425-432, 2009. 査読有
- ⑫ Kim CJ, Takimoto K, Tomita K, Osafune T, Nishikawa N, Johnin K, Okada Y: Evaluations for hydronephrosis of tubeless cutaneous ureterostomy using MAG3 diuretic renography. Clin Nucl Med 43: 666-669, 2009. 査読有

〔学会発表〕（計 9 件）

- ① Tambe Y, Inoue H: Role of the drs tumor suppressor in regulation of energy metabolism. 第 70 回日本癌学会総会、2011.10.3、名古屋
- ② Kim CJ, Tambe Y, Isono T, Mukaisho K, Sugihara H, Kondoh G, Inoue H: Role of cyclin D1b variant in rectal carcinogenesis. 第 70 回日本癌学会総会、2011.10.3、名古屋
- ③ Inoue H, sakamoto K, Tambe Y, Kim CJ: Cell-type dependent regulation of EMT and cell invasiveness of human cancer cells by periostin. 第 33 日本分子生物学会、2010.12.10、神戸
- ④ 旦部幸博、奥山直美、中川達也、井上寛一、癌抑制遺伝子 drs によるウイルス増殖抑制作用、第 33 日本分子生物学会、2010.12.8、神戸
- ⑤ Tambe Y, Chano T, Inoue H: The drs tumor suppressor is involved in the suppression of viral replication via p38-RSK1-S6 dependent pathway. 第 69 回日本癌学会総会、2010.9.23、大阪
- ⑥ Kim CJ, Tambe Y, Inoue H: Cell type-dependent regulation of EMT and cell invasiveness of cancer cells by periostin. 第 69 回日本癌学会総会、2010.9.22、大阪
- ⑦ 金 哲將、井上寛一、磯野高敬、岡田裕作、TAB1/TAK1 を介した Periostin による尿路上皮癌細胞での浸潤抑制活性の解析、第 98 回日本泌尿器科学会総会、2010.4.28、盛岡
- ⑧ Kim CJ, Isono T, Tambe Y, Okada Y, Inoue H: Functional analysis of variant cyclin D1b on the enhancement of cell invasiveness in bladder cancer cells. 第 67 回日本癌学会総会、2009.10.3、横浜
- ⑨ 金 哲將、磯野高敬、旦部幸博、岡田裕作、井上寛一、膀胱癌細胞における splicing variant cyclin D1 (cyclin D1b) における浸潤促進作用の解析、第 97

回日本泌尿器科学会総会、2009.4.7、岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 哲將 (KIM TETSUSYO)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10204968

(2) 研究分担者

井上 寛一 (INOUE HIROKAZU)

滋賀医科大学・医学部。准教授

研究者番号：30176440

